



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110121268 B

(45) 授权公告日 2023. 01. 31

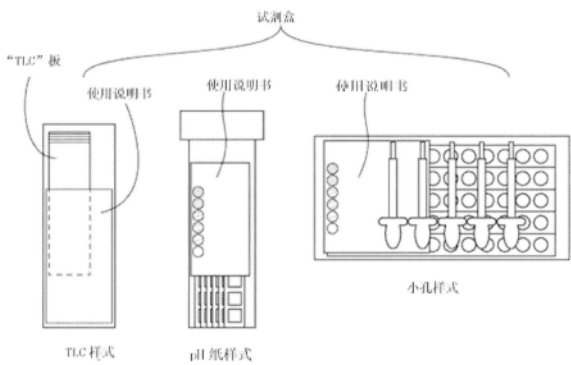
(21) 申请号 201680091908.5	(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
(22) 申请日 2016.12.27	专利代理师 郑斌 张福誉
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 110121268 A	(51) Int.Cl. A23K 20/158 (2006.01) A23K 50/40 (2006.01) A23K 50/42 (2006.01)
(43) 申请公布日 2019.08.13	(56) 对比文件 WO 0182720 A1,2001.11.08 CN 105722402 A,2016.06.29 CN 102469812 A,2012.05.23 K.R. Kerr.COMPANION ANIMALS SYMPOSIUM:Dietary management of feline lower urinary tract symptoms.《J. Anim. Sci.》.2013,(第91期), Hau D. Le等.The essentiality of arachidonic acid and docosahexaenoic acid.《Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids》.2009,(第81期),
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2019.06.27	审查员 李莺
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/US2016/068651 2016.12.27	权利要求书1页 说明书16页 附图12页
(87) PCT国际申请的公布数据 W02018/125029 EN 2018.07.05	
(73) 专利权人 希尔氏宠物营养品公司 地址 美国堪萨斯州	
(72) 发明人 丹尼斯·爱德华·朱厄尔 杰弗里·布罗克曼 达勒·舍尔 斯蒂芬·戴维森 克里斯蒂娜·戈尔德 艾伯特·阿维拉	

(54) 发明名称

宠物食品组合物

(57) 摘要

本文描述了用于尤其是降低猫科动物中尿的比重和降低草酸钙风险指数的方法和组合物。特别地,利用一定量和比率的花生四烯酸(AA)、二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)的饮食和方法。



1. 一种宠物食品组合物,其包含:

$\omega$ -6多不饱和脂肪酸补充剂,其中所述 $\omega$ -6多不饱和脂肪酸补充剂为花生四烯酸(AA);和

至少两种 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸补充剂,其中所述至少两种 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸补充剂包含二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA),

其中所述 $\omega$ -6多不饱和脂肪酸补充剂和所述至少两种 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸补充剂以有效于降低猫科动物中草酸钙风险指数(CORI)的量存在,

其中所述宠物食品组合物所具有的所述至少两种 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸补充剂的总和的量大于单独的 $\omega$ -6多不饱和脂肪酸补充剂的量,

其中AA:(EPA+DHA)的比率为0.1:1至0.9:1,

其中所述 $\omega$ -6多不饱和脂肪酸补充剂和所述至少两种 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸补充剂占所述宠物食品组合物的干重的0.3%至1%。

2. 根据权利要求1所述的宠物食品组合物,其中AA:(EPA+DHA)的比率在0.3:1至0.7:1的范围内。

3. 根据权利要求1所述的宠物食品组合物,其中AA:(EPA+DHA)的比率在0.4:1至0.6:1的范围内。

4. 根据权利要求1所述的宠物食品组合物,其中所述 $\omega$ -6多不饱和脂肪酸补充剂和所述至少两种 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸补充剂占所述宠物食品组合物的干重的0.4%至0.6%。

5. 根据权利要求1所述的宠物食品组合物,其中所述组合物具有在2:1至8:1的范围内的总 $\omega$ -6脂肪酸与总 $\omega$ -3脂肪酸的比率(n6:n3)。

6. 根据权利要求1所述的宠物食品组合物,其中所述组合物具有在4:1至7:1的范围内的总 $\omega$ -6脂肪酸与总 $\omega$ -3脂肪酸的比率(n6:n3)。

7. 根据权利要求1所述的宠物食品组合物,其中

AA:(EPA+DHA)的比率在0.4:1至0.6:1的范围内,并且

总 $\omega$ -6脂肪酸与总 $\omega$ -3脂肪酸的比率(n6:n3)在4:1至7:1的范围内。

8. 根据权利要求7所述的宠物食品组合物,其中所述组合物包含占所述宠物食品组合物的干重的0.4%至0.6%的范围内的AA、EPA和DHA的合并重量。

9. 根据权利要求1所述的宠物食品组合物,其中

AA:(EPA+DHA)的比率在0.4:1至0.6:1的范围内,并且

其中AA、EPA和DHA的合并重量占所述宠物食品组合物的干重的0.4%至0.6%。

10. 根据权利要求9所述的宠物食品组合物,所述组合物具有在4:1至7:1的范围内的总 $\omega$ -6脂肪酸与总 $\omega$ -3脂肪酸的比率(n6:n3)。

11. 根据权利要求1所述的组合物,其用于降低猫科动物中尿的比重。

12. 根据权利要求1所述的组合物,其用于降低猫科动物中的CORI。

13. 根据权利要求1所述的组合物,其用于治疗选自尿结石、猫特发性膀胱炎和猫下泌尿道疾病(FLUTD)的疾病或病状。

## 宠物食品组合物

### 背景技术

[0001] 家养的猫(家猫)能在沙漠条件下成功生存并适于通过产生与大多数其他哺乳动物相比高度浓缩的尿来保持水分。然而,产生高度浓缩的尿可能具有有害作用,例如增进了尿结石和其他不太明确的泌尿道病状如猫特发性膀胱炎的发展。常常由于水合不佳导致的猫泌尿道病状有时被称为猫下泌尿道疾病(FLUTD)。

[0002] FLUTD对猫来说可能是威胁到生命的病状。特别地,猫主人在FLUTD的情况下面对的一个问题是,该疾病在主人能注意到症状时已经威胁到猫的生命。晶体可能在猫的泌尿道中以结石形式沉淀并阻碍尿的流动。结石的类型包括磷酸铵镁、草酸钙、尿酸盐、胱氨酸、磷酸钙和硅酸盐。迄今为止,磷酸铵镁和草酸钙结石是猫中最常见的。如果放任不治疗,则“被阻塞”的猫会死亡,因为尿会倒流并损伤肾脏,并且毒素会积聚在血液中。

[0003] 如果可以诱导猫多饮水,那么这就可以稀释尿并由此改善由低水合造成的猫的泌尿道病状。这种稀释在两个层面上起作用:首先,通过降低尿中的电解质浓度(假设猫并不是单纯地多饮水来补偿较高的膳食盐),然后通过增加排尿频率并因此减少尿在膀胱中度过的时间量。猫通常只饮约30毫升水/公斤体重/天,并且难以增加自发饮用。提供湿态食品有助于增加饮水不太多的动物的水摄入量,但这可能还不够,或是因为仍未摄入足够的水或是因为其不能充分增加利尿。另外,表现出泌尿系综合征的猫通常肥胖或超重。因此,当需要治疗泌尿病症、特别是FLUTD时,提供湿态食品可能是优选的,但这是不够的,即,食物不能提供足够的水合,可能不被猫接受,或甚至可能在进食量控制不佳时诱导额外的超重和/或肥胖。

[0004] 在宠物食品组合物中引入某些 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸如二十二碳六烯酸(“DHA”)和二十碳五烯酸(“EPA”)是通常已知的。并且,虽然已知某些猫粮含有 $\omega$ -3和 $\omega$ -6多不饱和脂肪酸,但似乎没有任何教导或暗示脂肪酸在水合水平中起作用/起关键作用。因此,现在需要这样的方法和组合物,其增加猫的水合作用从而治疗、减轻、抑制或改善泌尿病状如FLUTD。

### 发明内容

[0005] 已惊奇地发现,控制猫粮中某些 $\omega$ -3和 $\omega$ -6多不饱和脂肪酸的比率将带来猫尿比重的降低和如由草酸钙风险指数(CORI)所指示草酸钙结石形成风险的降低。特别地,低于1的AA与EPA+DHA[AA:(EPA+DHA)]的比率会降低猫尿的比重并降低年轻和成熟的成年猫的CORI而不使动物脱水。

[0006] 在一些实施方案中,本公开涉及一种降低猫中尿的比重和CORI值的方法,其包括给猫饲喂包含AA、EPA和DHA的食品组合物,其中AA:(EPA+DHA)的比率在0.1:1至0.9:1的范围内并且AA、EPA和DHA的合并量为0.05干重%至1.5干重%。

[0007] 在一些实施方案中,本公开涉及一种降低猫中尿的比重和CORI值的方法,其包括给猫饲喂包含AA、EPA和DHA的食品组合物,其中AA:(EPA+DHA)的比率在0.1:1至0.9:1的范围内,AA、EPA和DHA的合并量为0.05干重%至1.5干重%,并且所述食品组合物具有在约2:1

至约8:1的范围内的总 $\omega$ -6脂肪酸与总 $\omega$ -3脂肪酸比率(n6:n3)。

[0008] 在一些实施方案中,本公开涉及一种治疗猫中因低水合作用所致疾病或病状的方法,其包括给猫饲喂含有AA、EPA和DHA的食品,其中AA:(EPA+DHA)的比率在0.1:1至0.9:1的范围内并且AA、EPA和DHA的合并量为0.05干重%至1.5干重%。

[0009] 在一些实施方案中,本公开涉及一种治疗猫中因低水合作用所致疾病或病状的方法,其包括给猫饲喂含有AA、EPA和DHA的食品,其中AA:(EPA+DHA)的比率在0.1:1至0.9:1的范围内,AA、EPA和DHA的合并量为0.05干重%至1.5干重%,并且所述食品组合物具有在约2:1至约8:1的范围内的总 $\omega$ -6脂肪酸与总 $\omega$ -3脂肪酸比率(n6:n3)。

[0010] 在一些实施方案中,本公开涉及一种适口的营养全面的猫粮组合物,其包含有效于改善猫中的水合作用的量的AA、EPA和DHA,其中所述食品组合物与水一起是适口并营养全面的而可作为猫的唯一饮食,并且其中AA:(EPA+DHA)的比率在0.1:1至0.9:1的范围内,并且AA、EPA和DHA的合并量为0.05干重%至1.5干重%。

[0011] 在进一步的实施方案中,本公开涉及一种适口的营养全面的猫粮组合物,其包含有效于改善猫中的水合作用的量的AA、EPA和DHA,其中所述食品组合物与水一起是适口并营养全面的而可作为猫的唯一饮食,并且其中AA:(EPA+DHA)的比率在0.1:1至0.9:1的范围内,AA、EPA和DHA的合并量为0.05干重%至1.5干重%,并且其中所述组合物具有引入其中的其他 $\omega$ -3和 $\omega$ -6脂肪酸。在此类实施方案中,食品组合物具有在约2:1至约8:1的范围内的总 $\omega$ -6脂肪酸与总 $\omega$ -3脂肪酸比率(n6:n3)。

[0012] 本发明的其他适用领域将由下文提供的详细说明变得显而易见。应理解,虽然详细描述和具体实施例指示了所公开主题的优选实施方案,但意图仅在于示意的目的而非意在限制本公开的范围。

## 附图说明

[0013] 根据详细说明和附图,将更完全地理解本发明,其中:

[0014] 图1示出了本发明的一个实施方案,其中多孔板包含许多包含不同浓度的碱金属草酸盐的碱金属草酸盐溶液并通过沿着多孔板的行连续稀释碱金属草酸盐溶液而制得。向另一个多孔板的孔中加入100 $\mu$ L等分试样的尿,从草酸盐板的孔中取100 $\mu$ L等分试样并加到尿板的对应孔中。

[0015] 图2A描绘了本发明的一个实施方案,其中多孔板包含许多包含不同浓度的碱金属草酸盐的碱金属草酸盐溶液并通过沿着多孔板的孔的行连续稀释碱金属草酸盐溶液而制得。

[0016] 图2B描绘了一种多孔板,其包含许多例如包含不同浓度的柠檬酸盐的柠檬酸盐溶液并通过顺着多孔板的孔的列连续稀释柠檬酸盐溶液而制得。

[0017] 图2C描绘了向另一个多孔板的孔中加入100 $\mu$ L等分试样的尿,从草酸盐板的孔中取100 $\mu$ L等分试样和从柠檬酸盐板的孔中取100 $\mu$ L等分试样并加到尿板的对应孔中。最终多孔板中的每一个孔现在都在特定体积的尿中含有特定浓度的柠檬酸盐和草酸盐。

[0018] 图3示出了8只不同的猫的尿在585nm下的吸光度相对于加到尿中的草酸盐的浓度的图。

[0019] 图4示出了证实传统滴定方法中添加的草酸盐的量与本发明的方法中最后一个澄

清孔中草酸盐的浓度之间的相关性的图。

[0020] 图5示出了不同的猫的尿在585nm下的吸光度相对于加到尿中的草酸盐的浓度的图。

[0021] 图6为示出实施例5的实验中针对每只猫的最后—个澄清孔中草酸盐的浓度的图表。

[0022] 图7示出了证实传统滴定方法中添加的草酸盐的量与本发明的方法中最后—个澄清孔中草酸盐的浓度之间的相关性的图。

[0023] 图8为根据本发明的试剂盒的示意图。图8a) 示出了包含具有Ca<sup>2+</sup>指示剂和单一均匀浓度的草酸盐的TLC载玻片的实施方案。图8b) 示出了包含具有Ca<sup>2+</sup>指示剂和梯度浓度的草酸盐的TLC载玻片的实施方案。图8c) 示出了具有“pH样式”纸的实施方案, 其中草酸盐和Ca<sup>2+</sup>指示剂提供在包含不同浓度草酸盐的垫中。图8d) 和8e) 分别示出了包含孔的条带的实施方案的顶视图和侧视图, 每个孔包含呈液体、凝胶或固体形式的草酸盐和Ca<sup>2+</sup>指示剂。孔的内容物可被覆盖以惰性水溶性膜。

[0024] 图9为本发明的试剂盒的TLC、pH纸和小孔实施方案的示意图。

## 具体实施方式

[0025] 以下对优选实施方案的描述本质上仅是示例性的而决不意图限制本公开的主题、其应用或用途。

[0026] 通篇使用的范围是用作描述在所述范围内的每个值的简写。范围内的任何值都可以被选为范围终点。此外, 本文中引用的所有参考文献都以全文引用的方式并入。如果本公开中的定义与所引用的参考文献中的定义发生冲突, 则以本公开为准。除非另有规定, 否则本文及说明书中其他地方表达的所有百分数和量均应理解为是指重量百分数。除非另有特别说明, 否则本文中表达的所有百分数均是基于干物质的重量计。

[0027] 在本公开的上下文中, 如本文所用, 术语“治疗 (treating)”或“治疗 (treatment)”意指逆转、减轻、减缓或抑制此类术语应用于的病症或病状的进展或者此类病症或病状的一个或多个症状。除非上下文中另有明确指出, 否则如本文和附随的权利要求书中所用, 单数形式“一个/一种”和“该/所述”包括复数指代。

[0028] 在本公开的上下文中, 术语“约”可指指定值的 $\pm 0.01\%$ 、 $\pm 0.1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 20\%$ 或 $\pm 25\%$ 的变化。例如, 在一些实施方案中, “约50%”可具有45%至55%的变化。还例如, 在一些实施方案中, “约0.5%”可具有0.45%至0.55%的变化。对于整数范围, 术语“约”可包括大于和/或小于所述整数的一个或两个整数。

[0029] 本公开涉及用于治疗家养的猫 (家猫) 的组合物和方法。然而, 普通技术人员应理解, 本文公开的组合物和方法可同样适用于较大种类的猫如狮子、美洲虎、猞猁等、狗、家畜、人、其他驯养宠物如兔子、仓鼠、沙鼠或南美洲栗鼠等或者其他哺乳动物。

[0030] 尿比重是尿稀释度的量度。比重越高, 尿越稠/浓。猫的尿比重的正常范围通常介于1.030和1.060之间。非常低的比重指示肾衰竭, 而高的尿比重意味着尿更浓并因此更可能发生结石沉淀而引起问题。

[0031] 尿比重通过以下组合来调节: (a) 通过肾小球过滤产生尿进入到肾脏的集尿管中和 (b) 从集尿管再吸收水回到血流中。此过程部分受类花生酸前列腺素E2 (PGE2) 调节。PGE2

结合到肾小管细胞上的前列腺素E受体并通过激活第二信使来调节水和钠通道,水和钠通道调节体内水和钠的平衡。

[0032] 使用猫的基因型与其各别尿比重之间的全基因组相关性研究,发明人已发现了含有由AA产生PGE<sub>2</sub>的途径中的关键酶前列腺素E合酶3基因的基因座。此外还已发现,猫饮食中不同的AA(PGE<sub>2</sub>的前体)与EPA+DHA比率与其尿比重相关。因此,已发现,调节饮食中AA的量可降低猫的尿比重。还已发现,即使饲喂了本公开的组合物的猫的尿更稀,但其血液渗透压也降低,表明这些动物正饮用更多的水并且其总体水平衡有所增加,即,它们的水合度更高。

[0033] 高的相对过饱和度(“RSS”)表明形成尿结石(草酸盐和磷酸铵镁结石二者)的倾向。已发现,比重的下降与RSS的下降相关联。因此,猫中更高水合度的尿的生物学益处在于结石形成风险的降低。

[0034] 尿石病管理是许多宠物食品制造商和独立研究人员的活跃研究领域。草酸钙风险指数(CORI)通过用草酸钠溶液滴定全尿直至发生沉淀来确定。通过用钙离子浓度([Ca<sup>2+</sup>])除以直至沉淀点时加入的草酸盐的量来计算CORI值。CORI还据信也是造成狗或猫尿中尿晶体抑制和促进的原因。与RSS一起进行的CORI测试可为降低宠物中草酸钙尿石形成的风险带来急需的洞察力。这种类型的组合测试还可提供临床相关信息,即针对尿石风险降低的特定疗法(饮食或药物)确实降低个体患者中草酸钙复发的风险。

[0035] 在一些实施方案中,使用包括以下的方法来确定CORI值:制备包括多个碱金属草酸盐样品的阵列,其中所述样品中的至少一个包含的碱金属草酸盐浓度不同于至少一个其他样品的碱金属草酸盐浓度;使已知体积的来自动物的尿样品与阵列的每一个碱金属草酸盐样品反应以在每一个样品中形成草酸钙;任选地与草酸钙结石形成改性剂一起孵育步骤b)中形成的每一个样品;和测定沉淀草酸钙所需的碱金属草酸盐的最小浓度,其中沉淀草酸钙所需的碱金属草酸盐的较低最小浓度与动物泌尿道中形成草酸钙结石的较高风险相关。在一些实施方案中,至少一个样品中碱金属草酸盐的浓度小于碱金属草酸盐发生饱和的浓度。在一些实施方案中,步骤a)中至少一个样品中碱金属草酸盐的浓度小于碱金属草酸盐发生饱和的浓度。在某些实施方案中,步骤b)中形成的至少一个样品中草酸钙的浓度小于草酸钙发生饱和的浓度。

[0036] 在一些实施方案中,每一个碱金属草酸盐样品包含碱金属草酸盐溶液、包含碱金属草酸盐的凝胶、固体碱金属草酸盐或沉积于表面上的碱金属草酸盐溶液。在一些实施方案中,步骤a)中的每一个碱金属草酸盐样品包含与阵列中的所有其他样品不同的碱金属草酸盐浓度。在一些实施方案中,阵列包含一组或多组碱金属草酸盐样品,其中一组中的每一个样品包含与该组中的所有其他样品不同的碱金属草酸盐浓度。

[0037] 在一些实施方案中,每一组碱金属草酸盐样品是每个其他组的复制。在其他实施方案中,每一个碱金属草酸盐样品在多孔板中的不同孔中提供。在进一步的实施方案中,多孔板的一行中的每个孔包含与该行中的每个其他孔不同的碱金属草酸盐浓度。在还其他的实施方案中,多孔板的一列中的每个孔包含与该列中的每个其他孔相同的碱金属草酸盐浓度。

[0038] 在一些实施方案中,不同的碱金属草酸盐浓度通过连续稀释碱金属草酸盐的溶液制备。在一些实施方案中,使阵列的每一个碱金属草酸盐样品与来自单个尿样品的不同等

分试样的尿反应。在一些实施方案中,使一组碱金属草酸盐样品的每一个碱金属草酸盐样品与来自单个尿样品的不同等分试样的尿反应。

[0039] 在一些实施方案中,分析多个尿样品。在某些实施方案中,使第一尿样品的等分试样与一组碱金属草酸盐样品反应,并出于比较的目的使一个或多个另外的尿样品各自与碱金属草酸盐样品的复制组反应。在其他实施方案中,所述一个或多个另外的尿样品从与第一样品相同的动物收集。在一些实施方案中,所述一个或多个另外的尿样品从与第一样品不同的动物收集。

[0040] 在一些实施方案中,每一等分试样的尿在多孔板中的不同孔中提供。在一些实施方案中,多孔板的一行中的每个孔包含与该行中的每个其他孔相同的草酸钙结石形成改性剂浓度。在一些实施方案中,多孔板的一列中的每个孔包含与该列中的每个其他孔不同的草酸钙结石形成改性剂浓度。在一些实施方案中,不同的改性剂浓度通过连续稀释改性剂的溶液制备。

[0041] 在一些实施方案中,草酸钙的沉淀通过测量尿的浊度来确定。在一些实施方案中,通过由吸光度光谱法测定尿的光密度来测量尿的浊度。在一些实施方案中,光密度在585nm的波长下测量。在一些实施方案中,草酸钙的沉淀通过测量尿样品中游离钙离子的浓度来确定,其中较低的游离钙离子浓度与增加的草酸钙沉淀相关。

[0042] 在一些实施方案中,尿样品中游离钙离子的浓度通过在步骤c)之后向每个样品中添加钙特异性报告染料来测定,并且其中染料的添加引起尿样品的颜色变化,且步骤b)中草酸钙的沉淀引起相对于不包含沉淀草酸钙的样品减少的颜色变化,这是游离钙离子浓度的降低导致的。在一些实施方案中,钙特异性报告染料选自Fluo-3、Fluo-4、fura-2、indo-1、calcium green-1、Oregon green、rhod-1、rhod-2、rhod-3、rhod-5F、x-Rhod、bapta-1、bapta-2和bapta-6F。在一些实施方案中,样品颜色的不存在对应于草酸钙从尿样品的完全沉淀。在一些实施方案中,碱金属草酸钠为草酸钠。

[0043] 在一些实施方案中,改性剂为盐、金属离子、小有机化合物、氨基酸、肽、蛋白质、核苷酸、多核苷酸、糖、低聚糖、代谢物或它们的任何组合。在其他实施方案中,改性剂为对草酸钙结石形成具有未知作用的化合物。在一些实施方案中,改性剂为柠檬酸盐、乳酸盐、磷酸盐、硫酸盐、碳酸盐、氯化物、镁、钠、尿酸、黄嘌呤、半胱氨酸、噻嗪类利尿剂、磷酸纤维素钠或它们的任何组合。在一些实施方案中,改性剂为柠檬酸钾。

[0044] 在一些实施方案中,在步骤b)之前测定尿样品中钙离子的浓度。在一些实施方案中,钙离子的浓度通过光谱法测定。在一些实施方案中,使用在步骤b)之前测定的尿样品中钙离子的浓度与从尿样品沉淀草酸钙所需的草酸根离子的最小量的比率来预测草酸钙结石形成的风险。

[0045] 在一些实施方案中,在步骤b)之前从尿样品去除颗粒物质。在一些实施方案中,在步骤b)之前稀释尿样品。在一些实施方案中,如果在步骤d)中预测到动物处于草酸钙结石形成风险下,则向动物给予将降低草酸钙结石形成风险的饮食。

[0046] 一些实施方案提供了一种预测饮食对动物泌尿道中草酸钙结石形成的风险或风险变化的影响的方法,其包括:i)给动物饲喂该饮食,和ii)使用本文所述方法中的任何一种来预测动物泌尿道中草酸钙结石形成的风险或风险变化。在一些实施方案中,步骤ii)在步骤i)之前和之后进行。

[0047] 其他实施方案提供了治疗泌尿道中发生草酸钙结石形成的风险较高的动物的方法,其包括(i)使用本文所述方法中的任何一种鉴定动物处于高风险,和(ii)给予动物将降低草酸钙结石形成风险的饮食。

[0048] 在一些实施方案中,使用试剂盒来预测动物中草酸钙结石的形成,其中所述试剂盒包含:i)多个碱金属草酸盐样品,每一个样品任选地包含不同浓度的碱金属草酸盐;ii)任选地一种或多种草酸钙结石形成改性剂;iii)任选地用于尿样品的容器;iv)用于检测钙离子浓度的措施,任选地钙特异性报告染料;和v)根据本文所述方法中的任一种使用所述试剂盒的使用说明书。在一些实施方案中,试剂盒包含容器,所述容器包含多个孔,并且每一个孔包含不同的碱金属草酸盐样品。在一些实施方案中,每一个孔的内容物被水溶性膜覆盖。在一些实施方案中,碱金属草酸盐样品被沉积在表面上。在某些实施方案中,碱金属草酸盐样品被沉积在间隔开的区域中。在一些实施方案中,所述间隔开的区域按碱金属草酸盐浓度增加的顺序排列。在一些实施方案中,样品被沉积为形成碱金属草酸盐浓度的梯度。在一些实施方案中,所述表面为纸或卡片。在其他实施方案中,所述表面为薄层色谱板。在一些实施方案中,沉积在表面上的碱金属草酸盐被水溶性膜覆盖。

[0049] 在至少一个实施方案中,本公开的组合物是营养全面的猫粮组合物。营养全面的组合物将提供包含足够营养物的饮食以维持健康猫的正常健康。营养全面的组合物是适口的并与水一起提供维持健康猫的正常健康所必需的所有营养的唯一来源。营养全面的组合物是本领域技术人员所熟悉的。举例来说,营养物和成分如本文公开的那些以及适合于动物饲料组合物的其他那些及它们的推荐量可见于例如Official Publication of the Associate of American Feed Control Officials("AAFCO"),Inc.,Nutrient Requirements of Dogs and Cats,2006中。举例来说,营养全面的食品可含有本领域技术人员已知的量的蛋白质、脂肪、碳水化合物、膳食纤维、氨基酸、矿物质、维生素和其他成分。

[0050] 蛋白质可由本领域技术人员已知的多种来源中的任何来源供应,包括植物来源、动物来源或二者。动物来源包括例如肉类、肉类副产品、海鲜、乳制品、蛋类等。肉类包括例如家禽、鱼和哺乳动物(例如,牛、猪、绵羊、山羊等)的肉。肉类副产品包括例如肺、肾脏、脑、肝脏以及胃和肠(除去其所有或基本上所有的内容物)。蛋白质可以是完好无损的、几乎完全水解的或部分水解的。本公开的组合物中典型的蛋白质量为至少约15%(或约15%至约55%、或约30%至约55%、或约33%至约36%)。

[0051] 脂肪可由本领域技术人员已知的多种来源中的任何来源供应,包括肉类、肉类副产品、鱼油和植物。植物脂肪来源包括小麦、亚麻籽、黑麦、大麦、稻米、高粱、玉米、燕麦、小米、小麦胚芽、玉米胚芽、大豆、花生和棉籽以及衍生自这些及其他植物脂肪来源的油。本公开的组合物通常含有至少约9%(或约9%至约35%、或约10%至约25%、或约15%至约22%)的总脂肪。

[0052] AA可由多种天然来源提供。肝脏例如鸡肝中的AA相对较高。EPA也可由多种天然来源如鱼油提供。除AA、EPA和DHA外,可作为脂肪组分的一部分包含在本发明的组合物中的脂肪酸包括其他 $\omega$ -3和 $\omega$ -6脂肪酸,如但不限于 $\alpha$ -亚麻酸、 $\gamma$ -亚麻酸、亚油酸、十八碳四烯酸(硬脂四烯酸)、硬脂酸、棕榈酸、棕榈油酸、油酸或其混合物。以干重为基础,本公开的组合物中总 $\omega$ -6与总 $\omega$ -3脂肪酸的比率(n6:n3)通常可在约2:1至8:1、或者约3:1至约7.5:1、或者约4:1至约7:1、或者约4.5:1至约6.5:1的范围内。



[0053] 在一些实施方案中,食品组合物包含AA、EPA和DHA,AA:(EPA+DHA)的比率可在约0.1:1至约0.9:1、或者约0.2:1至约0.8:1、或者约0.3:1至约0.7:1、或者约0.4:1至0.6:1的范围内。此外,以干重计,AA、EPA和DHA的合并量可占食品组合物的约0.05%至约1.5%、或者约0.1%至约1%、或者约0.2%至约0.8%、或者约0.3%至约0.7%、或者约0.4%至约0.6%。可使用包含小于1:1的AA:(EPA+DHA)比率的食物组合物来降低宠物的尿比重和CORI值,同时具有比AA:(EPA+DHA)比率高得多(例如,2:1至5:1)的相似食物组合物低的水分含量。

[0054] 在某些实施方案中,包含AA、EPA和DHA的食物组合物具有在约0.05%至约0.5%、或者约0.1%至约0.3%、或者约0.1%至约0.2%的范围内的量的AA。食物组合物中EPA和DHA的合并总量可在约0.1%至约1%、或者约0.2%至约0.8%、或者约0.3%至约0.6%、或者约0.3%至约0.5%的范围内。

[0055] 碳水化合物可由本领域技术人员已知的多种来源中的任何来源供应,包括燕麦纤维、纤维素、花生壳、甜菜浆、蒸谷米、玉米淀粉、玉米麸质粉及这些来源的任何组合。供给碳水化合物的谷物可包括但不限于小麦、玉米、大麦和稻米。食物的碳水化合物含量可通过本领域技术人员已知的任何数量的方法测定。通常,碳水化合物百分数可以无氮提取物(“NFE”)计算,其可如下计算: $NFE = 100\% - \text{水分}\% - \text{蛋白质}\% - \text{脂肪}\% - \text{灰分}\% - \text{粗纤维}\%$ 。

[0056] 膳食纤维是指抵抗动物消化酶的消化的植物组分。膳食纤维包括可溶性纤维和不可溶性纤维。可溶性纤维抵抗小肠中的消化和吸收并在大肠中进行完全或部分发酵,例如甜菜浆、瓜尔胶、菊苣根、车前草、果胶、蓝莓、蔓越莓、南瓜、苹果、燕麦、豆类、柑橘、大麦或豌豆。不溶性纤维可由多种来源中的任何来源供应,包括纤维素、全麦产品、小麦燕麦、玉米糠、亚麻籽、葡萄、芹菜、四季豆、花菜、土豆皮、水果皮、蔬菜皮、花生壳和大豆纤维。粗纤维包括含在植物如谷物的细胞壁和细胞内容物中的不可消化组分,例如谷物如稻米、玉米和大豆的壳。本公开的组合物中典型的纤维量可为约0%至10%或约1%至约5%。

[0057] 氨基酸,包括必需氨基酸,可以游离氨基酸形式加到本公开的组合物中,或由任何数量的来源(例如,粗蛋白)供给本公开的组合物。必需氨基酸是不能从头合成或由生物体足量合成的氨基酸,因此必须在饮食中提供。必需氨基酸在物种之间各不相同,具体取决于生物体的代谢。例如,通常理解的是狗和猫(以及人类)的必需氨基酸有苯丙氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苏氨酸、色氨酸、组氨酸和精氨酸。另外,牛磺酸尽管在技术上来说不是氨基酸而是半胱氨酸的衍生物,但对于猫来说是必需的营养物。

[0058] 本公开的组合物还可以避免缺乏和保持健康所需的量含有一种或多种矿物质和/或痕量元素,例如具有抗衡离子的钙、磷、钠、钾、镁、锰、铜、锌、铬、钼、硒或铁盐,例如氯化物、碘化物、氟化物、硫化物或氧化物。这些量是本领域技术人员已知的,例如,如Official Publication of the Associate of American Feed Control Officials, Inc. (“AAFCO”), Nutrient Requirements of Dogs and Cats, 2006中所提供。典型的矿物质的量为约0.1%至约4%或约1%至约2%。

[0059] 本发明的组合物还可以包括为了避免缺乏并保持健康所需量的维生素。这些量和测量方法是本领域技术人员已知的。举例来说,Official Publication of the Associate of American Feed Control Officials, Inc. (“AAFCO”), Nutrient Requirements of Dogs and Cats, 2006提供了此类成分用于狗和猫的推荐量。如本文所预期,维生素可包括

但不限于维生素A、维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、维生素B<sub>6</sub>、维生素B<sub>12</sub>、维生素C、维生素D、维生素E、维生素H(生物素)、维生素K、叶酸、胆碱、肌醇、烟酸和泛酸。本发明的组合物中典型的维生素量为约0%至约3%或约1%至约2%。

[0060] 本公开的组合物还可以本领域技术人员熟悉的量和组合包含其他添加剂如适口性增强剂和稳定剂。稳定化物质包括例如倾向于延长组合物的保存期限的物质。潜在地适合于包含在本发明的组合物中的其他此类添加剂的其他实例包括例如防腐剂、着色剂、抗氧化剂、调味剂、协同增效剂和螯合剂、封装气体、稳定剂、乳化剂、增稠剂、胶凝剂和保湿剂。乳化剂和/或增稠剂的实例包括例如明胶、纤维素醚、淀粉、淀粉酯、淀粉醚和改性淀粉。组合物中此类添加剂的浓度通常可能达至约5重量%。在一些实施方案中,此类添加剂(特别是在此类添加剂为主要营养均衡剂如维生素和矿物质的情况下)的浓度为约0重量%至约2.0重量%。在一些实施方案中,此类添加剂(同样,特别是在此类添加剂为主要营养均衡剂的情况下)的浓度为约0重量%至约1.0重量%。

[0061] 涵盖任何稠度或水分含量的食品,例如,本发明的组合物可例如为干态、湿态或半湿态的动物食品组合物。在一些实施方案中,水分含量为组合物总重量的约3%至约90%。“半湿态”是指含有约25%至约35%水分的食品组合物。“湿态”食品是指具有约60%至90%或更高水分含量的食品组合物。“干态”食品是指具有约3%至约11%水分含量的食品组合物并常常制造为小块或粗粒形式。

[0062] 在制备湿态或罐装形式的本发明组合物时,任何成分(例如,AA、EPA、DHA)通常可例如在制剂加工过程中引入到组合物中,如在混合组合物的其他组分期间和/或之后。此等组分在组合物中的分布能够通过常规方式完成。在一些实施方案中,将研磨过的动物和家禽蛋白质组织与其他成分混合,包括鱼油、谷粒、其他营养均衡成分、特殊目的添加剂(例如,维生素和矿物质混合物、无机盐、纤维素和甜菜浆、填充剂等);并还加入足够进行加工的水。这些成分可在适于加热同时共混组分的容器中混合。混合物的加热可使用任何合适的方式实现,例如通过直接蒸汽喷射或通过使用装配有热交换器的容器实现。在添加最后的成分之后,可将混合物加热至约50°F (10°C) 至约212°F (100°C) 的温度范围。在一些情况下,可将混合物加热至约70°F (21°C) 至约140°F (60°C) 的温度范围。这些范围之外的温度通常是可接受的,但在不使用其他加工助剂的情况下可能在商业上不切实际。当加热到适当温度时,材料典型地将呈浓稠液体的形式。可将浓稠液体装填到罐中。当装填到罐中时,加盖并气密封容器。然后可将密封的罐放入设计为对内容物进行杀菌的常规设备中。这通常通过加热到超过约230°F (110°C) 的温度达适当的时间来完成,所述适当的时间取决于例如所用温度和组成。

[0063] 或者,宠物食品组合物可用常规方法制备成干态形式。通常,将干态成分(包括例如动物蛋白质、植物蛋白质、谷物等)研磨并混合于一起。然后加入湿态或液体成分(包括脂肪、油、动物蛋白质、水等)并与干态混合物混合。然后将混合物加工成粗粒或类似的干片。通常使用挤出工艺来形成粗粒,其中使干态成分与湿态成分的混合物在高压和高温下经受机械功、迫使通过小开口并由旋转刀切割成粗粒。然后将湿粗粒干燥并任选地包覆以一种或多种局部涂层,该涂层可包括例如调味剂、脂肪、油、粉料等。粗粒也可由面团使用烘焙工艺而非挤出来制成,其中将面团放入模具中,然后进行干热加工。

[0064] 在用于使猫水合或治疗猫中疾病或病状的本公开方法中,给予的食品可以是营养

全面的猫粮或可分开给予必需的量 and 比率的AA、EPA和DHA,例如作为单独的成分或作为单独的成分的一部分,通常作为补充剂,使得进食的总饮食满足产生本公开的有益效果所必需的AA、EPA和DHA的量和比率。在治疗猫中疾病或病状的本公开的方法中,所述疾病或病状可以是例如尿结石、猫特发性膀胱炎或FLUTD的发展。

[0065] 在一些实施方案中,本发明提供了一种宠物食品组合物,其包含有效于降低猫科动物中草酸钙风险指数(CORI)的量的 $\omega$ -6多不饱和脂肪酸补充剂和至少两种 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸补充剂,该饮食具有的所述至少两种 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸补充剂的总和的量大于单独的 $\omega$ -6多不饱和脂肪酸补充剂的量。其他实施方案提供了一种宠物食品组合物,其包含有效于降低猫科动物中草酸钙风险指数(CORI)的量的 $\omega$ -6多不饱和脂肪酸补充剂和至少两种 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸补充剂,该饮食具有的所述至少两种 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸补充剂的总和的量大于单独的 $\omega$ -6多不饱和脂肪酸补充剂的量。

[0066] 在一些实施方案中, $\omega$ -6多不饱和脂肪酸补充剂包含花生四烯酸(AA)并且所述至少两种 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸补充剂包含二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)。在一些实施方案中, $\omega$ -6多不饱和脂肪酸补充剂为花生四烯酸(AA)并且所述至少两种 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸补充剂为二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)。

[0067] 一些实施方案提供了包含有效量的花生四烯酸(AA)、二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)的组合物用于降低猫科动物中尿的比重用途。其他实施方案提供了包含有效量的花生四烯酸(AA)、二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)的组合物用于降低猫科动物中的CORI的用途。

[0068] 在一些实施方案中,本发明提供了一种宠物食品组合物,其以有效于降低猫科动物中的CORI的量包含花生四烯酸(AA)、二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA),其中AA:(EPA+DHA)的比率在约0.4:1至约0.6:1的范围内,并且总 $\omega$ -6脂肪酸与总 $\omega$ -3脂肪酸的比率(n6:n3)在约4:1至约7:1的范围内。

[0069] 在一些实施方案中,宠物食品组合物包含合并重量在宠物食品组合物的干重的约0.4%至约0.6%的范围内的AA、EPA和DHA。

[0070] 其他实施方案提供了一种宠物食品组合物,其以有效于降低猫科动物中的CORI的量包含花生四烯酸(AA)、二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA),其中AA:(EPA+DHA)的比率在约0.4:1至约0.6:1的范围内,并且其中AA、EPA和DHA的合并重量为宠物食品组合物的干重的约0.4%至约0.6%。

[0071] 还其他的实施方案提供了一种改善猫科动物中的水合水平的方法,其包括向猫科动物提供包含有效量的 $\omega$ -6多不饱和脂肪酸补充剂和至少两种 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸补充剂的饮食,其中所述饮食将降低所述猫科动物中的CORI。

[0072] 在一些实施方案中,宠物食品组合物或基于其的饮食使得CORI降低至少10%。在其他实施方案中,宠物食品组合物或基于其的饮食使得CORI降低至少25%。

[0073] 在其他实施方案中,水合水平在足以治疗选自尿结石、猫特发性膀胱炎和FLUTD的疾病或病状的程度上得到改善。

[0074] 还进一步的实施方案提供了一种保持或实现猫科动物中内稳定的水合水平的方法,其包括向有需要的猫科动物提供包含有效量的 $\omega$ -6多不饱和脂肪酸补充剂和至少两种 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸补充剂的饮食。

[0075] 以下实施例中将进一步描述本发明。这些实施例仅是说明性的并且不以任何方式限制本发明的如所描述和要求保护的的范围。

[0076] 实施例

[0077] 实施例1

[0078] 下表1中描述了四 (4) 个对比较方和三 (3) 个本发明的示例性配方。

[0079] 表1

	对比例				实施例		
	对比 例 1	对比 例 2	对比 例 3	对比 例 4	实施例 1	实施例 2	实施例 3
组分	重量/重量% (干态)						
粗蛋白	37.15	33.78	33.75	32.17	33.85	33.6	34.16
脂肪	18.02	23.71	14.65	17.38	19.93	16.49	16.70
粗纤维	3.32	2.16	2.14	3.24	0.99	0.92	1.79
钙	0.95	1.19	1.86	1.41	0.76	0.71	0.84
磷	0.73	1.02	1.33	1.18	0.58	0.53	0.75
灰分	5.46	6.7	8.08	8.14	5.72	5.42	5.56
亮氨酸	4.03	2.43	2.9	2.54	2.94	3.2	3.8
异亮氨酸	1.27	0.97	0.89	0.89	1.12	1.07	1.30
赖氨酸	2.35	1.79	1.31	1.44	1.76	1.61	1.45
甲硫氨酸	1.42	1.11	0.75	1.12	0.98	0.77	0.95
胱氨酸	0.52	0.38	0.46	0.41	0.74	0.74	0.48
n-3 脂肪酸*	0.64	0.52	0.25	0.41	0.81	0.6	0.46
n-6 脂肪酸*	3.52	4.38	2	3.69	3.95	3.52	3.01
n6:n3	5.5:1	8.4:1	8:1	9:1	4.9:1	5.8:1	6.5:1
AA	0.09	0.15	0.05	0.1	0.17	0.17	0.16
EPA + DHA	0.35	0.12	0.09	0.17	0.37	0.36	0.27
AA : (EPA +DHA)	0.26	1.25	0.56	0.59	0.46	0.48	0.59
AA+EPA+DHA	0.44	0.27	0.14	0.27	0.54	0.53	0.43

[0081] \*值表示配方中脂肪酸的总量。

[0082] 实施例2

[0083] 进行饲喂研究以评估饮食对CORI的影响。给十二 (12) 只猫饲喂对照饮食, 并给十二 (12) 只猫饲喂根据本公开的具有低的AA: (EPA+DHA) 比率的试验饮食。对照饮食含有0.07重量%的AA和0.02重量%的合并EPA和DHA, 从而产生3.5:1的AA: (EPA+DHA) 比率, 并含有5.15重量%的水分含量。试验饮食含有0.16重量%的AA和0.27重量%的合并EPA和DHA, 从而产生0.59:1的AA: (EPA+DHA) 比率, 并含有5.11重量%的水分含量。让这些猫保持其相应的饮食达五十六 (56) 天。

[0084] 于第A天、第B天和第C天收集来自每只猫的尿并分析。在饲喂期间内, 饲喂对照饮食的猫表现出54.5的平均CORI值。在此相同期间, 饲喂根据本发明的某些实施方案的试验

饮食的猫表现出40.2的平均CORI值。如本实施例所示,用试验饮食饲喂的猫表现出草酸钙结石形成风险26%的降低。

#### [0085] 实施例3

[0086] 进行饲喂研究以评估饮食对尿比重的影响。给十二(12)只猫饲喂实施例1的对照饮食,并给十二(12)只猫饲喂实施例1的试验饮食。让这些猫保持其相应的饮食达五十六(56)天。于第零(0)天、第二十八(28)天和第五十六(56)天收集来自每只猫的尿并分析尿比重。在此饲喂期间内,饲喂对照饮食的猫表现出1.056的平均尿比重。同时,饲喂根据本公开的试验饮食的猫表现出1.053的平均尿比重。如本实施例所示,用试验饮食饲喂的猫表现出较不浓缩(即较不浓)的尿,尽管饲喂饮食的水分比对照饮食少0.04重量%。

#### [0087] 实施例4

[0088] 仅草酸盐的方法。向96孔微滴定板的第一列(8个孔)中置入草酸盐,并沿着行连续稀释。在图1中示出的实施例中,在第一列中置入300 $\mu$ L250mM的草酸盐,同时向所有其他孔中置入150 $\mu$ L载体。然后,从第一列取出150 $\mu$ L草酸盐溶液并在第二列中与150 $\mu$ L载体合并。混合后,在整个板上重复此过程,使得每一列中草酸盐较前一列稀释一(1)倍。

[0089] 在单独的板中,向每一个孔中置入100 $\mu$ L哺乳动物的澄清尿。然后,向尿板中加入100 $\mu$ L连续稀释的草酸盐,同时保持草酸盐稀释位置(例如,将来自草酸盐板的R1:C1置入尿板的R1:C1中)。

[0090] 混合后,在设置为发射585nm光的板读取器中评估草酸钙的沉淀。该波长下的吸光度与每一个孔中沉淀的量之间存在正相关。

#### [0091] 实验结果

[0092] 使用来自八只猫的尿样品来评估这种方法区分显示为抵抗草酸盐结石形成的猫与显示为几乎不或不具有抵抗性的那些猫的能力。在专门设计的垃圾托盘中为每一只猫分别收集尿,收集24小时。然后用这些尿样品通过传统滴定方法和此外通过该96孔方法来得出CORI结果。如仅草酸盐的方法中所述一式两份设置板。下表2中示出的数据为两个板的平均值。

[0093] 表2

板设置 实验 1												
	mM 草酸盐 (最终浓度)											
Andrew	125	62.5	31.3	15.63	7.81	3.91	1.95	0.98	0.49	0.24	0.12	0.06
Corn Pop	125	62.5	31.3	15.63	7.81	3.91	1.95	0.98	0.49	0.24	0.12	0.06
Wells	125	62.5	31.3	15.63	7.81	3.91	1.95	0.98	0.49	0.24	0.12	0.06
Marie	125	62.5	31.3	15.63	7.81	3.91	1.95	0.98	0.49	0.24	0.12	0.06
Maverick	125	62.5	31.3	15.63	7.81	3.91	1.95	0.98	0.49	0.24	0.12	0.06
Pdawn	125	62.5	31.3	15.63	7.81	3.91	1.95	0.98	0.49	0.24	0.12	0.06
Honey Cluster	125	62.5	31.3	15.63	7.81	3.91	1.95	0.98	0.49	0.24	0.12	0.06
Cadbury	125	62.5	31.3	15.63	7.81	3.91	1.95	0.98	0.49	0.24	0.12	0.06

[0094]

[0095]

数据 实 验 1												
	板读取器											
Andrew	0.086	0.093	0.089	0.085	0.087	0.086	0.090	0.084	0.085	0.086	0.093	0.089
Corn Pop	0.081	0.081	0.078	0.075	0.086	0.079	0.077	0.074	0.075	0.077	0.087	0.077
Wells	0.165	0.157	0.153	0.138	0.121	0.118	0.119	0.123	0.119	0.120	0.120	0.115
Marie	0.136	0.142	0.129	0.118	0.114	0.114	0.105	0.100	0.108	0.110	0.115	0.106
Maverick	0.150	0.153	0.138	0.123	0.124	0.124	0.122	0.121	0.123	0.126	0.128	0.127
Pdawn	0.164	0.146	0.138	0.133	0.095	0.095	0.073	0.076	0.076	0.076	0.086	0.073
Honey Cluster	0.145	0.133	0.126	0.118	0.128	0.128	0.123	0.124	0.120	0.124	0.132	0.129
Cadbury	0.117	0.117	0.115	0.094	0.098	0.098	0.102	0.091	0.099	0.094	0.097	0.092

[0096] 草酸盐板设置成使得125mM的草酸盐置入第一个孔中并在整个板上连续稀释。当100 $\mu$ L的这些草酸盐溶液被稀释到100 $\mu$ L尿中时,最终的草酸盐浓度如上表2“板设置实验1”中所述。混合后,于585nm下定量吸光度,得到上表2中的“数据实验1”和图3中所示的曲线图。该曲线图的数据是通过归一化至每一只猫的第一吸光度数据点生成的。

[0097] 使用图3中示出的曲线图确定沉淀开始的点,并将在此之前的那个孔定义为“最后一个澄清孔”。将最后一个澄清孔中草酸盐的浓度与传统滴定方法中引起沉淀的草酸盐浓度进行比较给出两种方法之间良好的相关性(参见图4)。还可以将数据拟合为曲线(例如,S形)并以数学方法确定沉淀开始的拐点。

[0098] 进行第二项研究以确认第一项研究的结果。试验两个板,其中大多数猫是重复用到的。在若干情况下,猫只用到一次。数据在下表3中呈现。板设置按上述方法进行。

[0099] 表3

[0100]

板设置 1 实验 2												
	mM 草酸盐 (最终浓度)											
Honey Cluster	125	62.5	31.3	15.63	7.81	3.91	1.95	0.98	0.49	0.24	0.12	0.06
Elrod	125	62.5	31.3	15.63	7.81	3.91	1.95	0.98	0.49	0.24	0.12	0.06
Andrew	125	62.5	31.3	15.63	7.81	3.91	1.95	0.98	0.49	0.24	0.12	0.06
Marie	125	62.5	31.3	15.63	7.81	3.91	1.95	0.98	0.49	0.24	0.12	0.06
Wells	125	62.5	31.3	15.63	7.81	3.91	1.95	0.98	0.49	0.24	0.12	0.06
Maverick	125	62.5	31.3	15.63	7.81	3.91	1.95	0.98	0.49	0.24	0.12	0.06
Corn Pop	125	62.5	31.3	15.63	7.81	3.91	1.95	0.98	0.49	0.24	0.12	0.06
Arlette	125	62.5	31.3	15.63	7.81	3.91	1.95	0.98	0.49	0.24	0.12	0.06

[0101]

板设置 2 实验 2												
	mM 草酸盐 (最终浓度)											
Ardella	125	62.5	31.3	15.63	7.81	3.91	1.95	0.98	0.49	0.24	0.12	0.06
Algott	125	62.5	31.3	15.63	7.81	3.91	1.95	0.98	0.49	0.24	0.12	0.06
Pdawn	125	62.5	31.3	15.63	7.81	3.91	1.95	0.98	0.49	0.24	0.12	0.06
Arlette	125	62.5	31.3	15.63	7.81	3.91	1.95	0.98	0.49	0.24	0.12	0.06
Marie	125	62.5	31.3	15.63	7.81	3.91	1.95	0.98	0.49	0.24	0.12	0.06
Wells	125	62.5	31.3	15.63	7.81	3.91	1.95	0.98	0.49	0.24	0.12	0.06
Maverick	125	62.5	31.3	15.63	7.81	3.91	1.95	0.98	0.49	0.24	0.12	0.06
Elrod	125	62.5	31.3	15.63	7.81	3.91	1.95	0.98	0.49	0.24	0.12	0.06

[0102] 来自两个板的数据在表4和图5中提供。这次, 曲线图的数据归一化至前3个数据点。

[0103] 表4

[0104]

数据 实验 2 板 1												
	板读取器											
Honey Cluster	0.096	0.105	0.103	0.096	0.101	0.094	0.101	0.101	0.100	0.104	0.099	0.100
Elrod	0.073	0.079	0.070	0.069	0.067	0.068	0.071	0.070	0.073	0.069	0.068	0.066
Andrew	0.151	0.171	0.149	0.121	0.087	0.087	0.088	0.091	0.092	0.105	0.090	0.089
Marie	0.093	0.094	0.093	0.091	0.091	0.091	0.095	0.098	0.098	0.105	0.098	0.095
Wells	0.455	0.427	0.430	0.404	0.351	0.351	0.173	0.152	0.152	0.130	0.141	0.154
Maverick	0.305	0.300	0.293	0.240	0.171	0.171	0.156	0.156	0.162	0.161	0.164	0.165
Corn Pop	0.080	0.082	0.082	0.080	0.082	0.082	0.082	0.086	0.085	0.097	0.084	0.083
Arlette	0.157	0.190	0.155	0.122	0.113	0.113	0.116	0.124	0.128	0.161	0.126	0.124

[0105]

数据 实验 2 板 2												
	板读取器											
Ardella	0.169	0.172	0.149	0.123	0.122	0.119	0.129	0.128	0.124	0.122	0.122	0.122
Algott	0.328	0.330	0.330	0.310	0.233	0.122	0.125	0.127	0.124	0.122	0.123	0.124
Pdawn	0.161	0.160	0.153	0.130	0.102	0.087	0.085	0.085	0.087	0.087	0.091	0.089
Arlette	0.149	0.149	0.148	0.130	0.127	0.132	0.134	0.143	0.140	0.137	0.147	0.142
Marie	0.100	0.105	0.101	0.100	0.102	0.103	0.104	0.104	0.104	0.106	0.105	0.102
Wells	0.518	0.485	0.469	0.461	0.373	0.231	0.191	0.193	0.197	0.209	0.208	0.202
Maverick	0.364	0.373	0.357	0.290	0.229	0.218	0.223	0.223	0.230	0.223	0.223	0.253
Elrod	0.079	0.083	0.078	0.074	0.075	0.077	0.077	0.076	0.077	0.077	0.078	0.079

[0106] 在此第二个实验中, 许多猫具有澄清的最后一个孔 (参见图6)。因为无法确定最后一个澄清孔将落在何处, 故进一步的计算中排除了这些猫。

[0107] 使用图5确定沉淀开始的点, 并将在此之前的那个孔定义为“最后一个澄清孔”。将最后一个澄清孔中草酸盐的浓度与传统滴定方法中引起沉淀的草酸盐浓度进行比较给出这些方法之间优异的相关性 (参见表5和图7)。

[0108] 表5

[0109]

	最后一个澄清孔 中草酸盐的浓 度, mM	传统滴定中添加 的草酸盐, $\mu\text{mol}$
<i>Corn Pop*</i>	125	50.0
<i>Elrod 1*</i>	125	25.0
<i>Elrod 2*</i>	125	23.8
<i>Honey Cluster*</i>	125	27.5
<i>Marie 1*</i>	125	38.8
<i>Marie 2*</i>	125	42.5
Maverick 1	7.8	13.8
Maverick 2	7.8	13.8
Pdawn	3.9	10.0
Wells 1	2	6.3
Wells 2	2	7.5
Algott	3.9	10.0
Andrew	7.8	13.8
Ardella	15.6	27.5
Arlette 1	15.6	25.0
Arlette 2	15.6	23.8
*具有最高草酸盐浓度的孔是澄清的。因此, 引起沉淀到底需要多高的草酸盐浓度是未知的。所以, 这些数据的使用是靠不住的, 故从进一步的计算中排除。		

[0110] 实施例5

[0111] 草酸盐外加第二成分的方法。为了评估可能影响草酸盐结石形成抵抗性的其他尿成分的作用, 可进行类似的检测, 但在一个维度上连续稀释草酸盐并在第二个维度上连续稀释感兴趣的成分。图2示意了柠檬酸盐对草酸盐结石形成抵抗性的评估, 但此相同原理可用于任何感兴趣的第二成分。

[0112] 如上所述制备草酸盐板。用感兴趣的物质(例如, 柠檬酸盐)制备第二板。然而, 在此情况下, 连续稀释顺着板的列而不是沿着行进行。第三板如上所述用于尿。

[0113] 向100 $\mu\text{L}$ 尿中加入100 $\mu\text{L}$ 来自连续稀释成分板的成分, 同时保持成分稀释位置(例如, 将来自成分板的R1:C1置入尿板的R1:C1中)。混合后, 向尿板中加入100 $\mu\text{L}$ 连续稀释的草酸盐, 同时保持草酸盐稀释位置(例如, 将来自草酸盐板的R1:C1置入尿板的R1:C1中)。第二次混合后, 在设置为发射585nm光的板读取器中评估草酸钙的沉淀。该波长下的吸光度与每一个孔中沉淀的量之间存在正相关。

[0114] 通过这种一般样式, 我们设想不仅能够检测对草酸钙结石形成的抵抗性, 而且还能够通过沿着同一96孔板的行以降低(或增加)的浓度置入试验化合物来测试潜在的第二个结石形成抑制剂。以此方式, 板用于草酸盐和感兴趣的潜在第二抑制剂(例如, 柠檬酸盐)二者。

[0115] 在实践中, 将已知体积的尿置入清洁的96孔板的所有孔中。在通过顺着其自身的板的行稀释此抑制剂的浓度而产生感兴趣的第二抑制剂(例如, 柠檬酸盐)的新板后, 向尿



板加入来自此板的已知体积的抑制剂并混合,同时保持抑制剂稀释位置(例如,将来自抑制剂的R1:C1置入尿板的R1:C1中)。还使用上述方法产生草酸盐板,并然后向尿+第二抑制剂板加入草酸盐,同时保持草酸盐稀释位置(例如,将来自草酸盐板的R1:C1置入尿/抑制剂板的R1:C1中)。然后使用上述吸光度方法定量草酸钙沉淀程度,从而允许确定模型系统中草酸盐和第二抑制剂对抑制草酸钙结石形成的影响。

[0116] 鉴于这些实验的成功,确定了同样的原理也可应用于可用于实验室或诊所环境中的试验试剂盒。另外还评价了几种不同的样式。这些试剂盒将允许评估草酸盐结石形成风险和治疗结果。下面是几个非限制性实例。实际设计可不同(例如,添加次序、每一成分的量等)。

[0117] 第一试剂盒直接取自上面的样式,但孔排成单行。使用单行孔(类似于96孔板的单个行)进行此分析。首先随着沿行移动以依次更高的量向每一个孔装填草酸盐。草酸盐可呈固体、液体或凝胶形式,包含将结合尿中的游离钙的钙特异性染料。这些染料可为(但不限于):fura-2、indo-1、fluo-3、fluo-4、Calcium Green-1、Oregon green、BAPTA-1、BAPTA-2、x-Rhod、Rhod-3或任何其他仅在游离钙的存在下显示颜色的报告染料。然后,每一个孔可或可不被覆盖以可溶于水的薄的快速溶解膜(就像无活性物或香料的呼吸条)以在使用之前保护每一个孔的内容物。

[0118] 使用时,向每一个孔加入已知体积的尿,使得尿与草酸盐和游离钙特异性报告染料接触。来自尿的钙将与草酸盐结合并以草酸钙从溶液沉淀出。任何剩余的游离钙都会与钙特异性报告染料络合并且孔会改变颜色。模型系统中使得钙完全沉淀(并因此不存在颜色)所需的草酸盐的量与尿的成分抑制草酸盐结石形成的能力有关。

[0119] 在本发明的第二派生物中,针对使用孔的试验讨论的原理被转换到多垫pH样式条带。在此情况下,将草酸盐(以增加的浓度)与钙报告染料一起加到pH样式纸的垫中。这些垫然后可被覆盖以可溶于水的薄的快速溶解膜(就像无活性物或香料的呼吸条)以在使用之前保护每一个孔的内容物。在实践中,将该条带浸入尿中,任何仍具有游离钙的垫将改变颜色。模型系统中使得钙完全沉淀(并因此不存在颜色)所需的草酸盐的量与尿的成分抑制草酸盐结石形成的能力有关。

[0120] 在本发明的第三派生物中,上述原理将以类似薄层色谱法(TLC)的样式使用。将草酸盐沉积在TLC板上,草酸盐的浓度从底部向顶部增加。游离钙特异性报告染料也被包埋在该基质中。在实践中,将板浸渍到小量尿中,并且尿将朝向顶部迁移。在某一时刻,增加的

[0121] 草酸盐浓度将会多价螯合所有剩余的游离钙,故染料将不再改变颜色。模型系统中在无色之前尿爬板向上行进的远近与尿的成分抑制草酸盐结石形成的能力有关。

[0122] 在本发明的此派生物的一个轻微变型中,草酸盐浓度在整个TLC板上保持恒定。来自尿的钙仍会爬板向上行进直至草酸盐多价螯合全部钙。模型系统中在无色之前尿爬板向上行进的远近与尿的成分抑制草酸盐结石形成的能力有关。

[0123] 图8和9中示出了示例性的试剂盒,仅出于说明的目的,而不应理解为唯一的样式或类型。

[0124] 虽然已选择特定的实施方案说明本发明,但本领域技术人员应理解,可在不脱离如由附随的权利要求书限定的本发明范围的情况下作各种改变和修改。本领域普通技术人员应易于认识,在本发明的一些非限制性实施方案中,在不同的视图中描绘的特征可以有

各种组合。

[0125] 另外,本文引用的所有参考文献以引用方式整体并入本文。如果本公开中的定义与所引用的参考文献中的定义发生冲突,则以本公开为准。

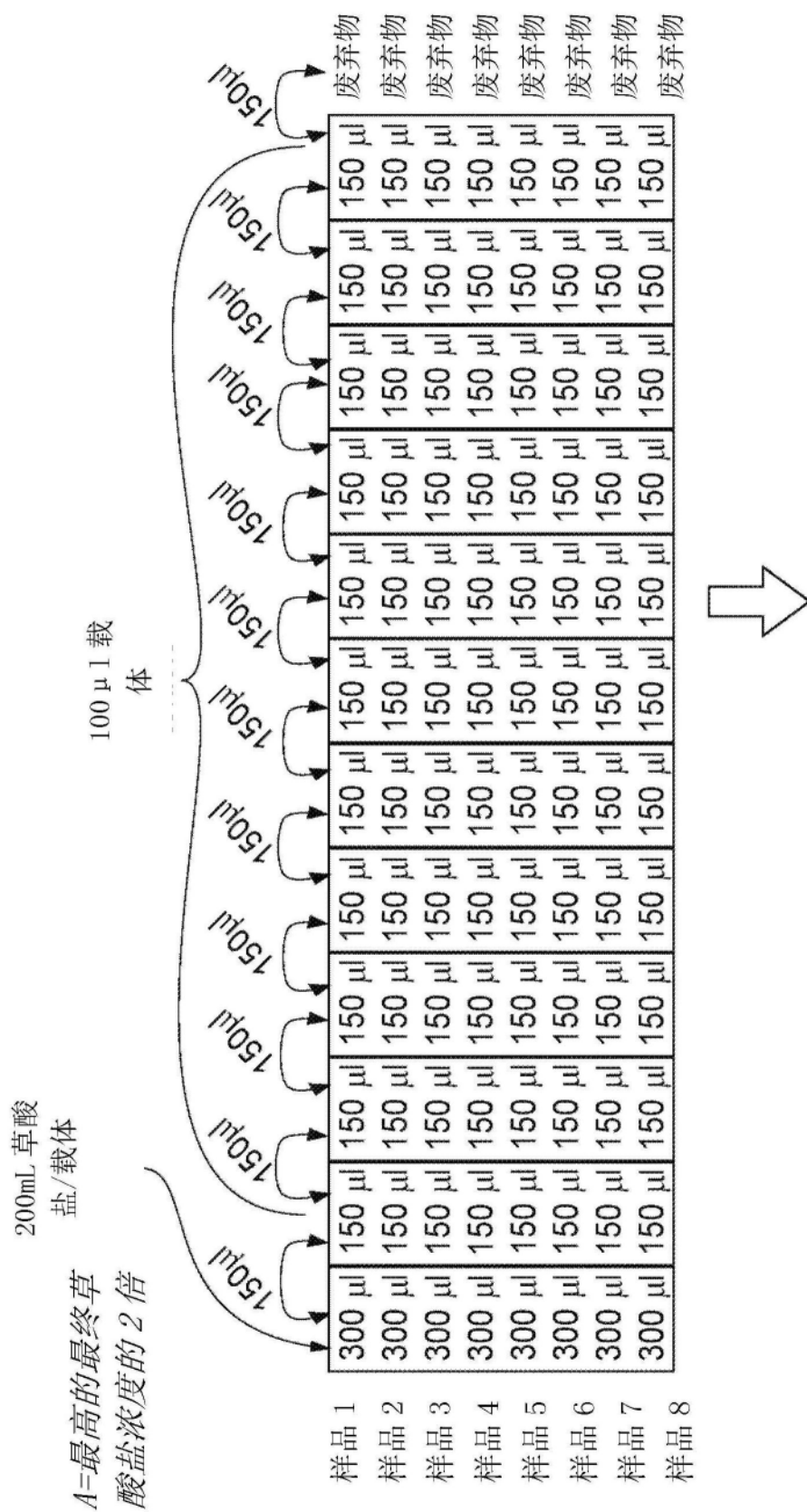


图1

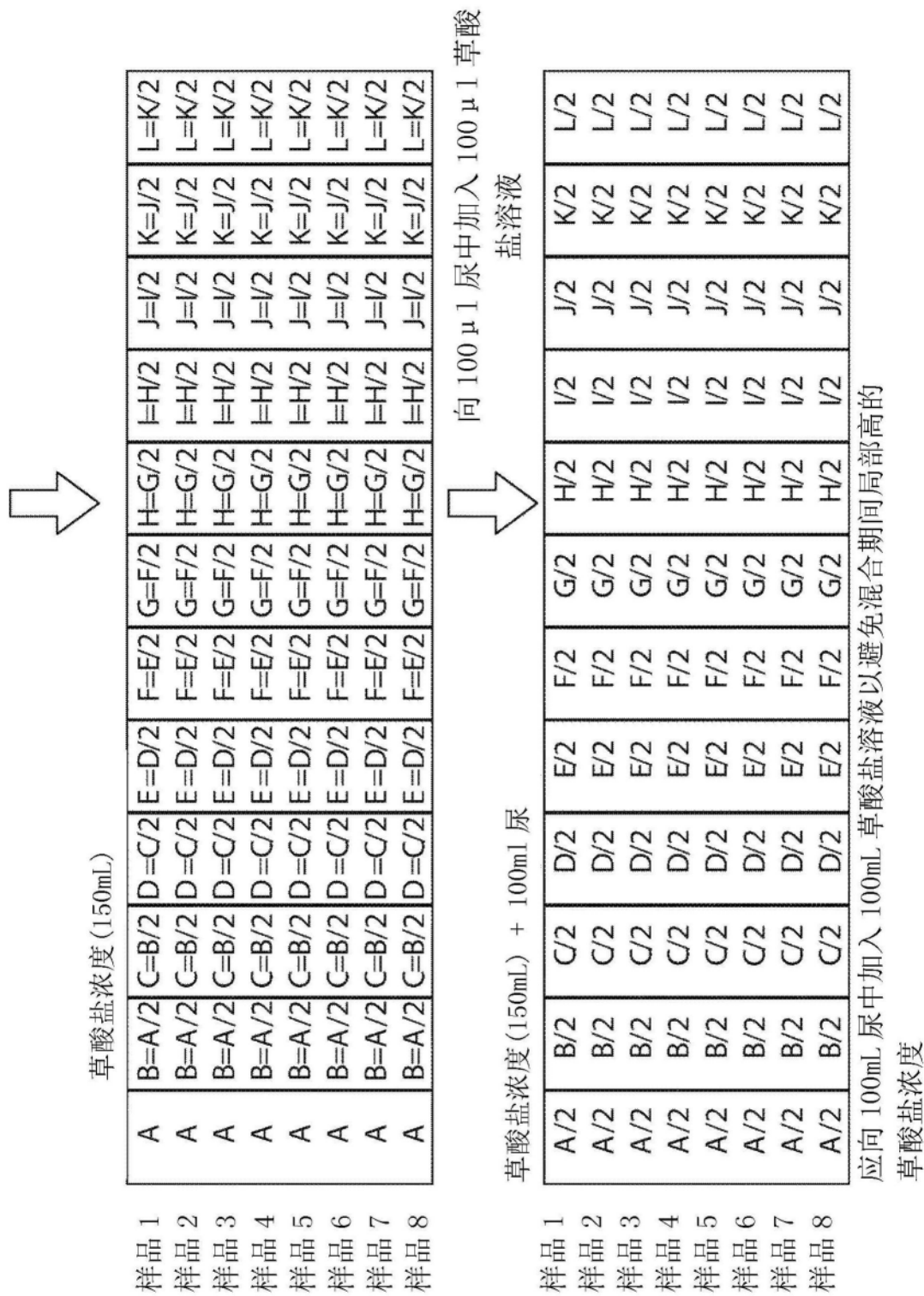


图1 (续)

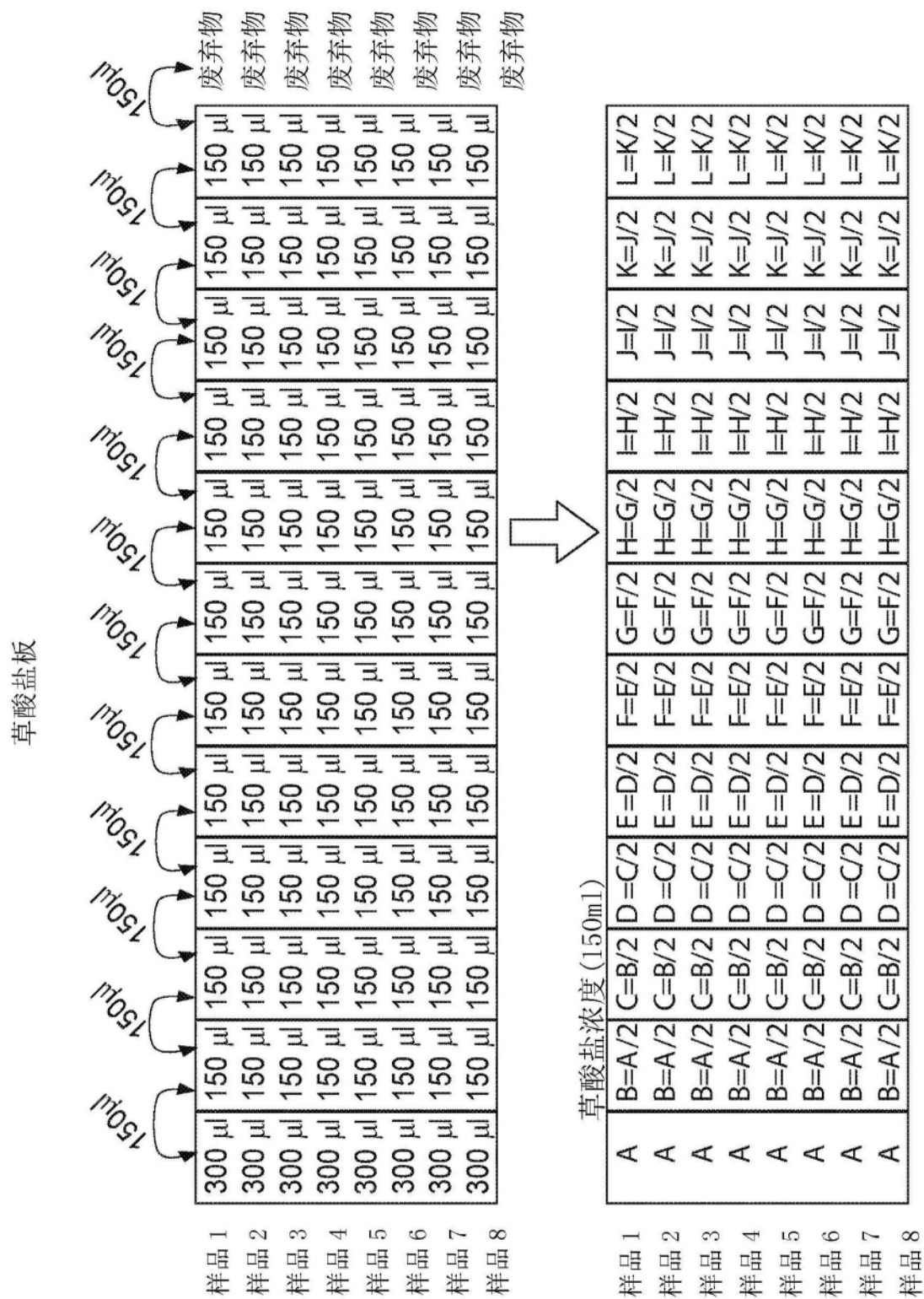


图2A

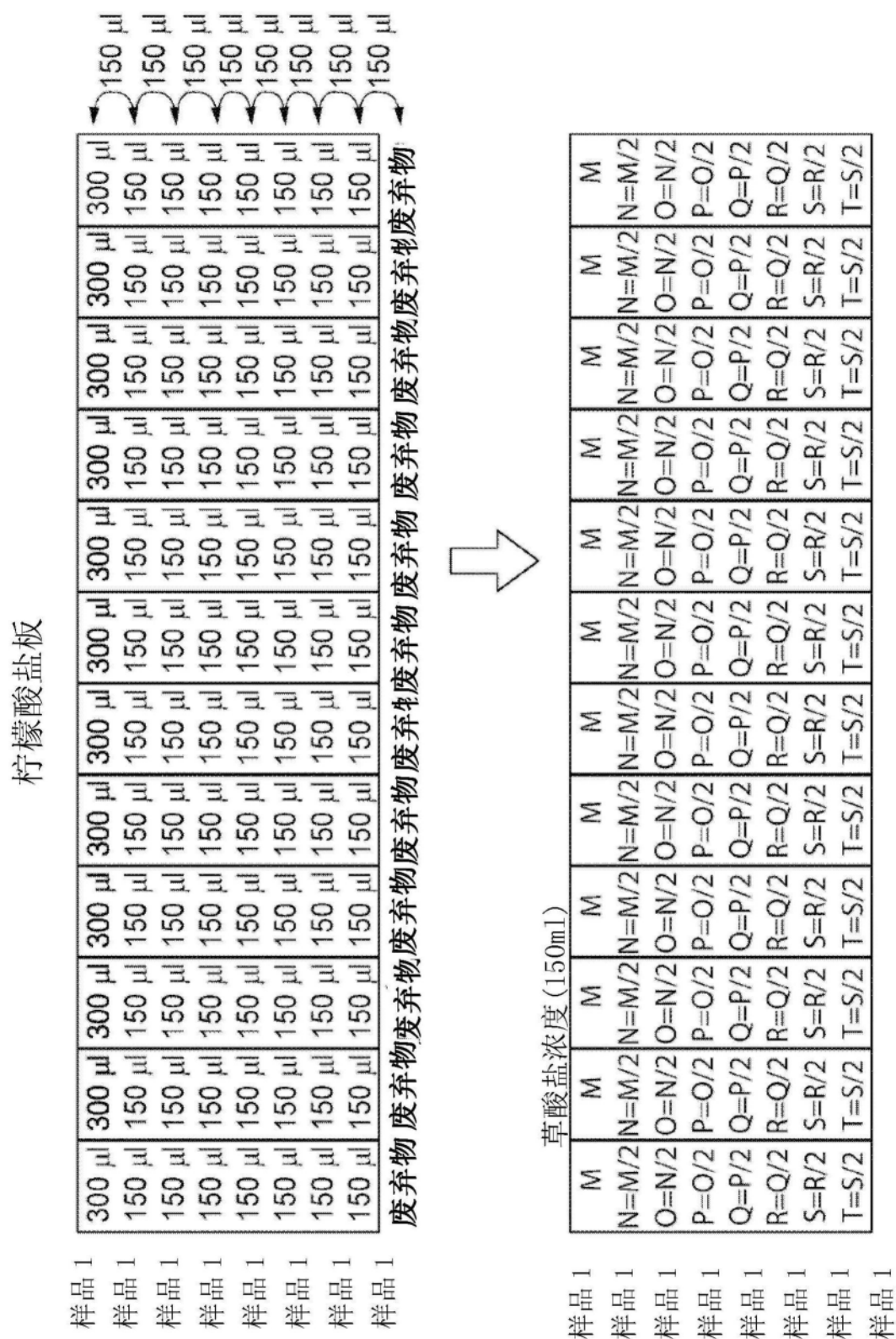


图2B

尿板

100  $\mu$ l 尿 + 100  $\mu$ l 来自（例如）柠檬酸盐板的对应孔的溶液 +  
100  $\mu$ l 来自草酸盐板的对应孔的溶液

样品 1	A/3+M/3	B/3+M/3	C/3+M/3	D/3+M/3	E/3+M/3	F/3+M/3	G/3+M/3	H/3+M/3	I/3+M/3	J/3+M/3	K/3+M/3	L/3+M/3
样品 1	A/3+N/3	B/3+N/3	C/3+N/3	D/3+N/3	E/3+N/3	F/3+N/3	G/3+N/3	H/3+N/3	I/3+N/3	J/3+N/3	K/3+N/3	L/3+N/3
样品 1	A/3+O/3	B/3+O/3	C/3+O/3	D/3+O/3	E/3+O/3	F/3+O/3	G/3+O/3	H/3+O/3	I/3+O/3	J/3+O/3	K/3+O/3	L/3+O/3
样品 1	A/3+P/3	B/3+P/3	C/3+P/3	D/3+P/3	E/3+P/3	F/3+P/3	G/3+P/3	H/3+P/3	I/3+P/3	J/3+P/3	K/3+P/3	L/3+P/3
样品 1	A/3+Q/3	B/3+Q/3	C/3+Q/3	D/3+Q/3	E/3+Q/3	F/3+Q/3	G/3+Q/3	H/3+Q/3	I/3+Q/3	J/3+Q/3	K/3+Q/3	L/3+Q/3
样品 1	A/3+R/3	B/3+R/3	C/3+R/3	D/3+R/3	E/3+R/3	F/3+R/3	G/3+R/3	H/3+R/3	I/3+R/3	J/3+R/3	K/3+R/3	L/3+R/3
样品 1	A/3+S/3	B/3+S/3	C/3+S/3	D/3+S/3	E/3+S/3	F/3+S/3	G/3+S/3	H/3+S/3	I/3+S/3	J/3+S/3	K/3+S/3	L/3+S/3
样品 1	A/3+T/3	B/3+T/3	C/3+T/3	D/3+T/3	E/3+T/3	F/3+T/3	G/3+T/3	H/3+T/3	I/3+T/3	J/3+T/3	K/3+T/3	L/3+T/3

图2C

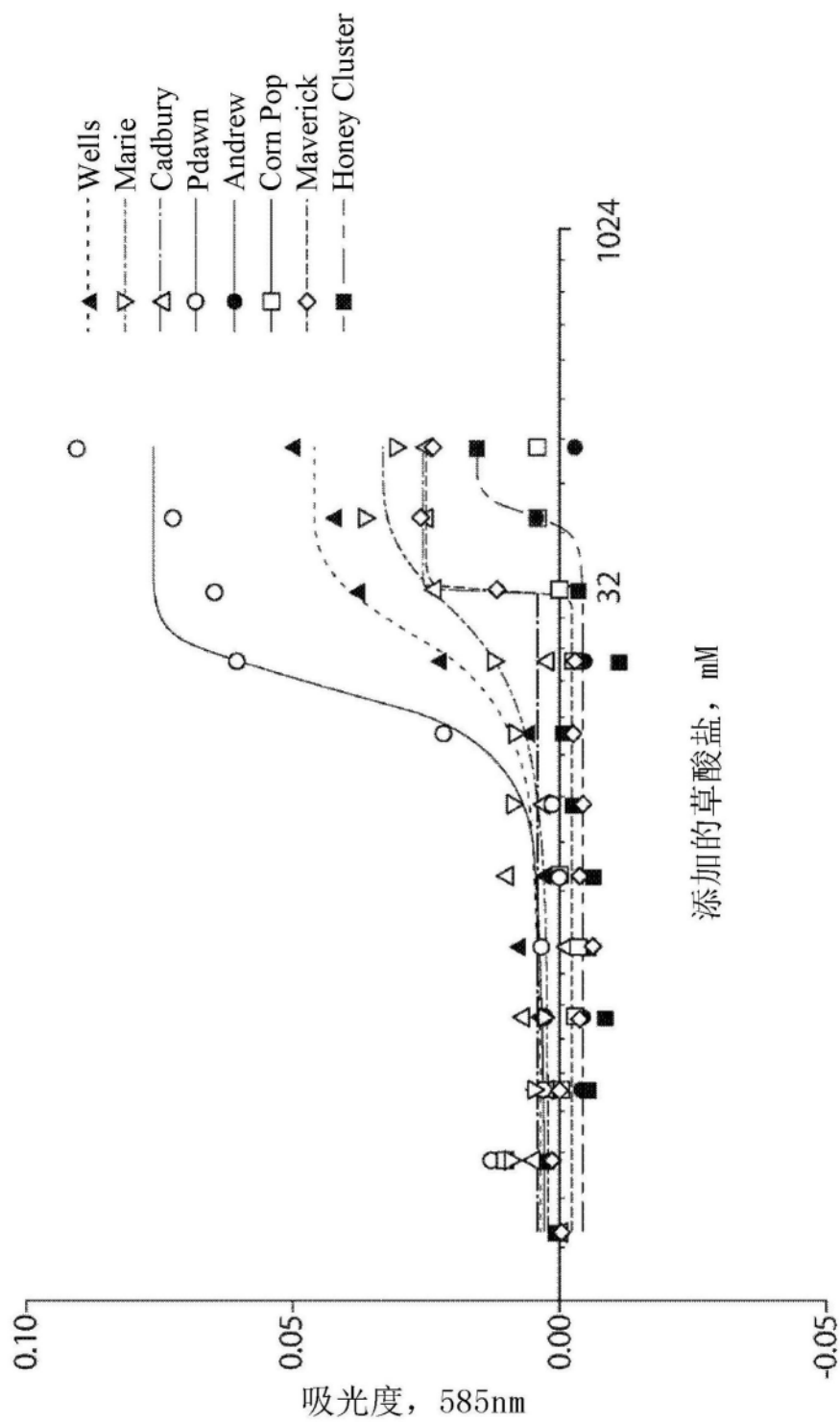


图3



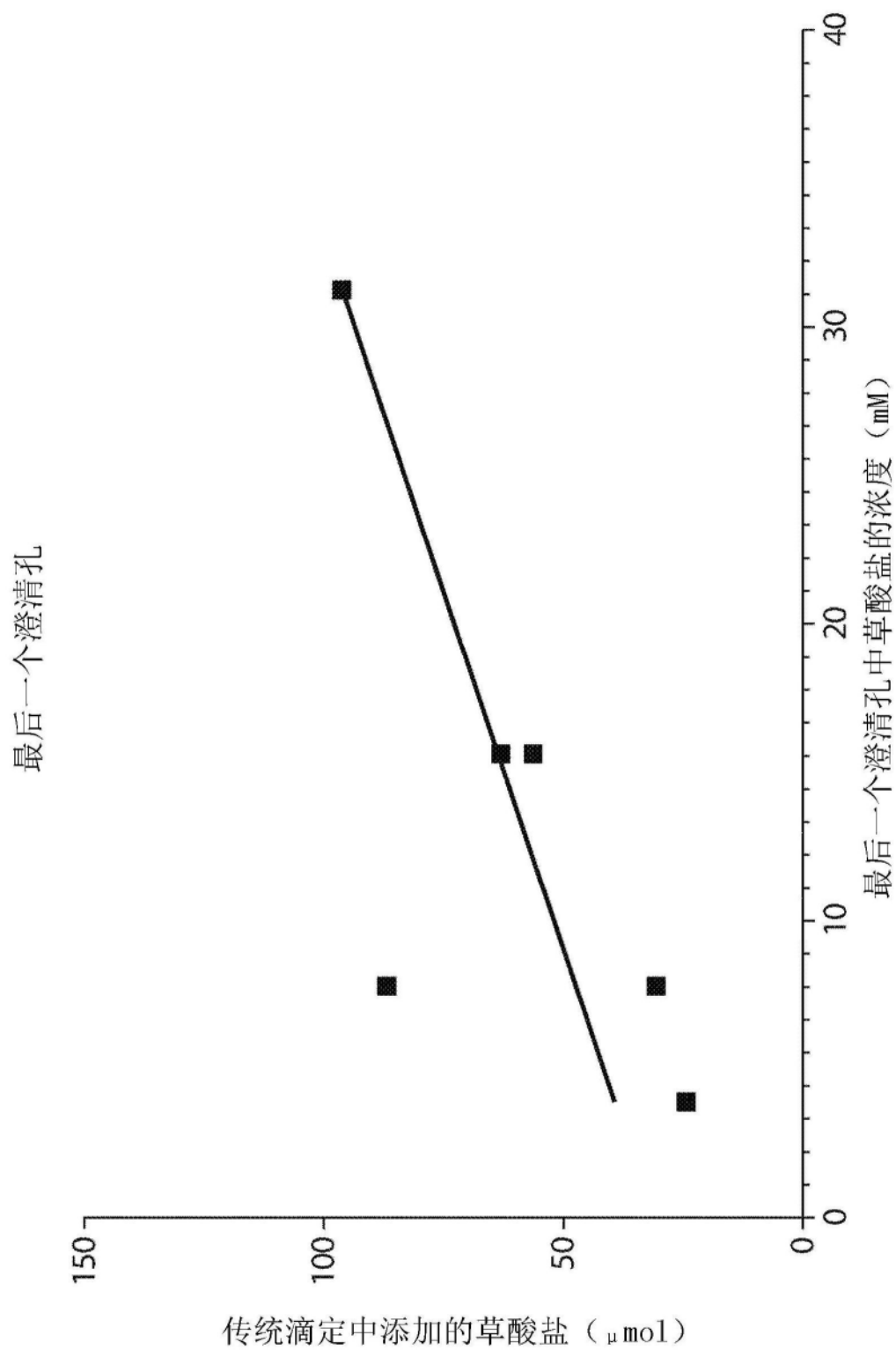


图4

基线校正板 1 和 2

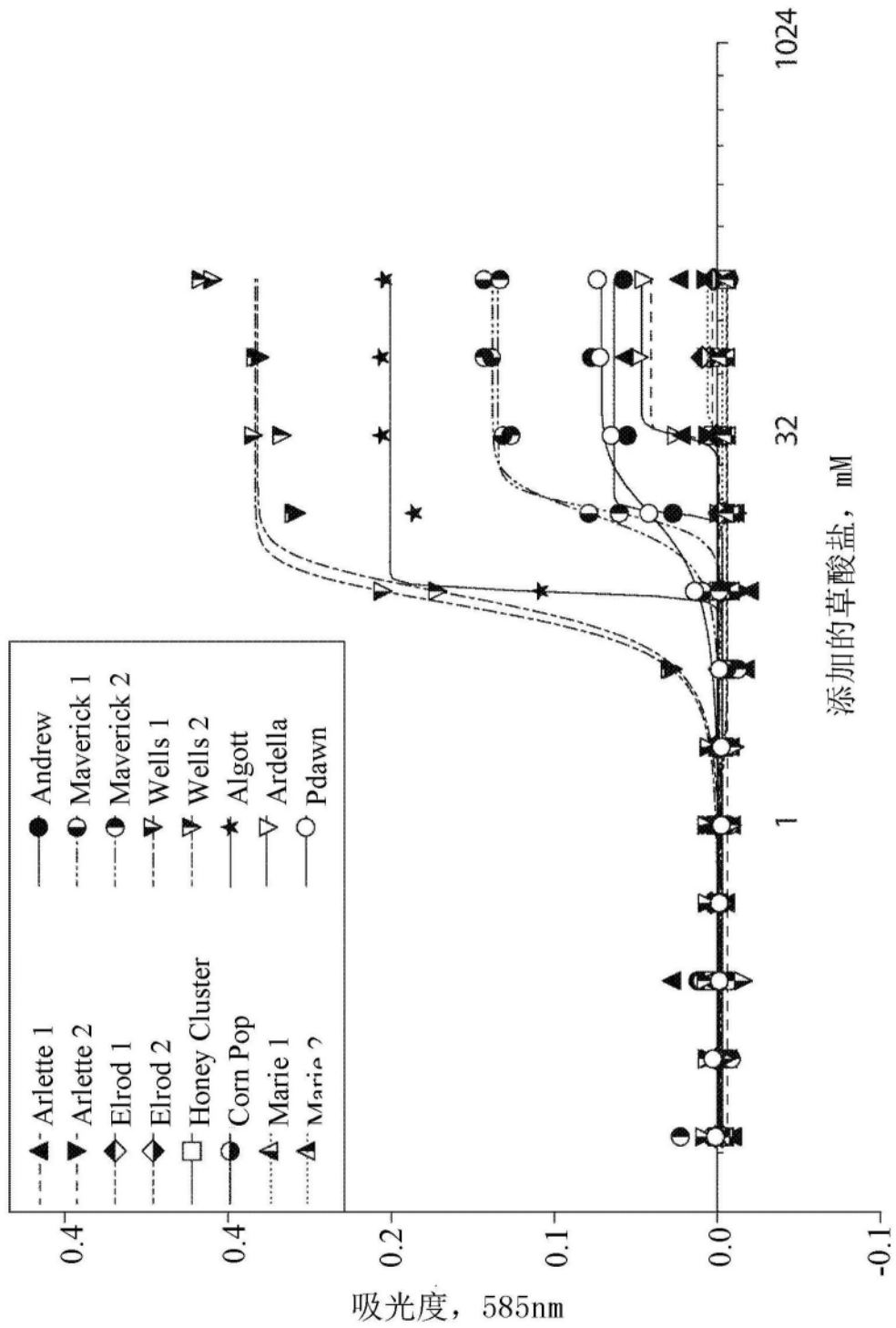


图5

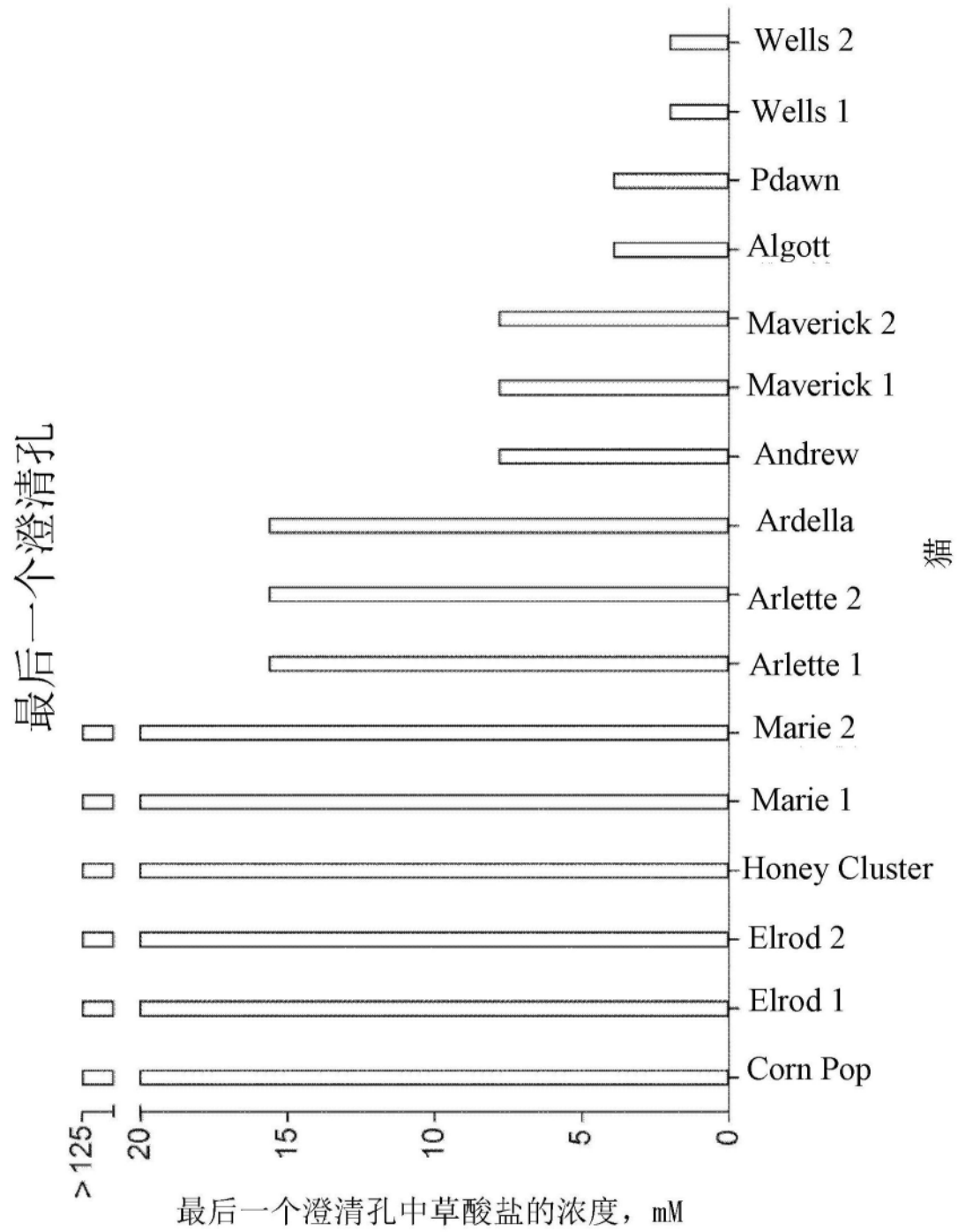


图6

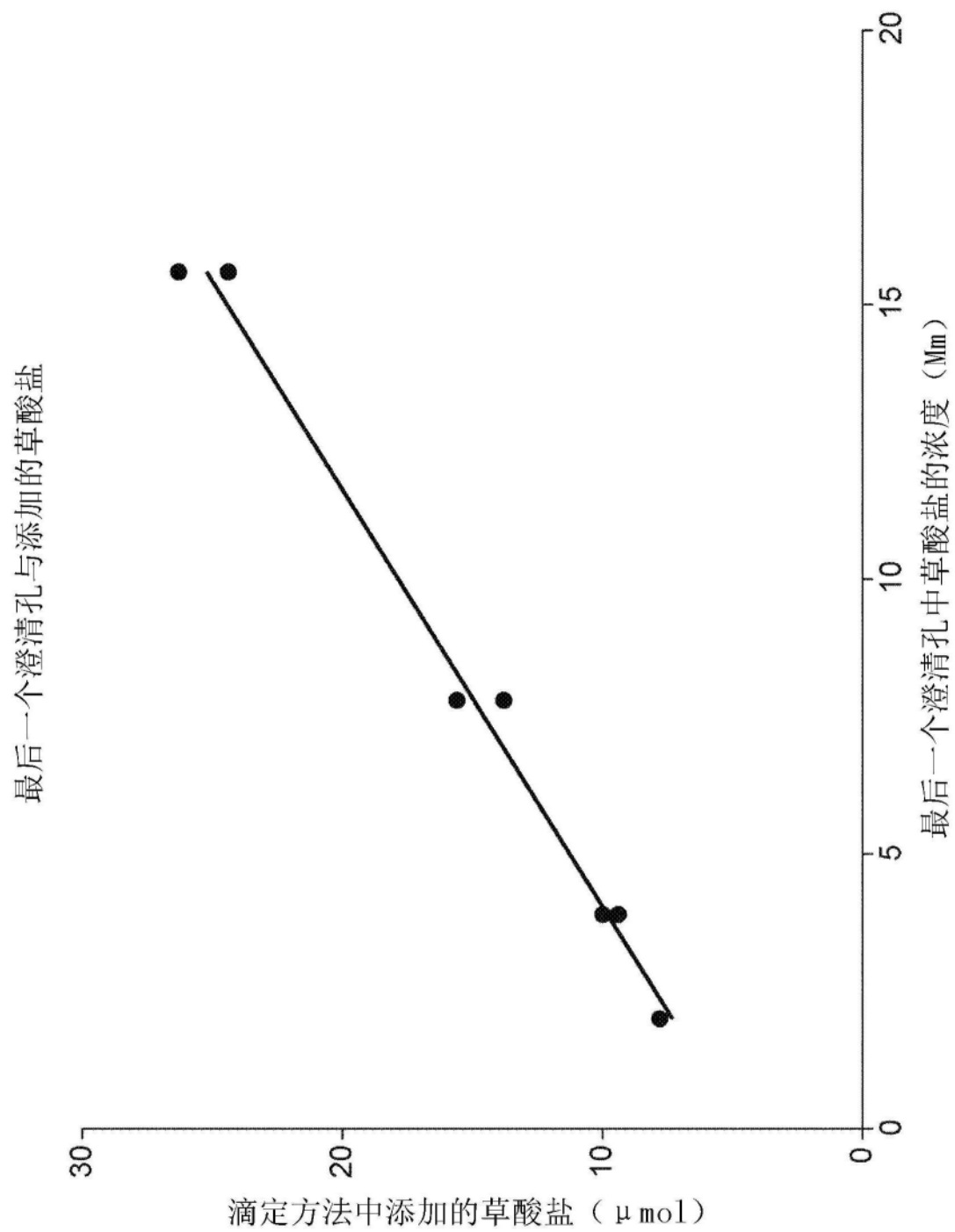
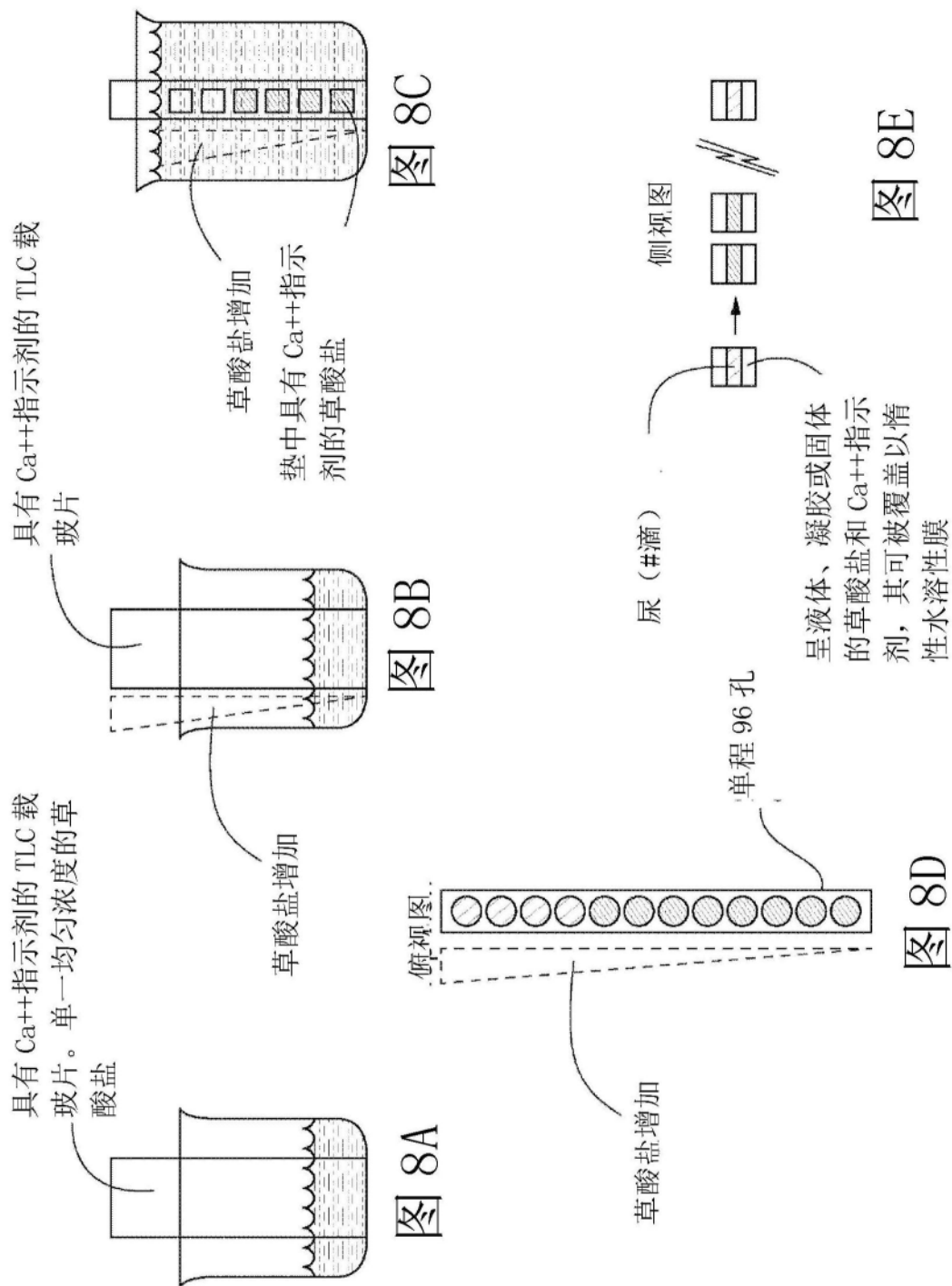


图7



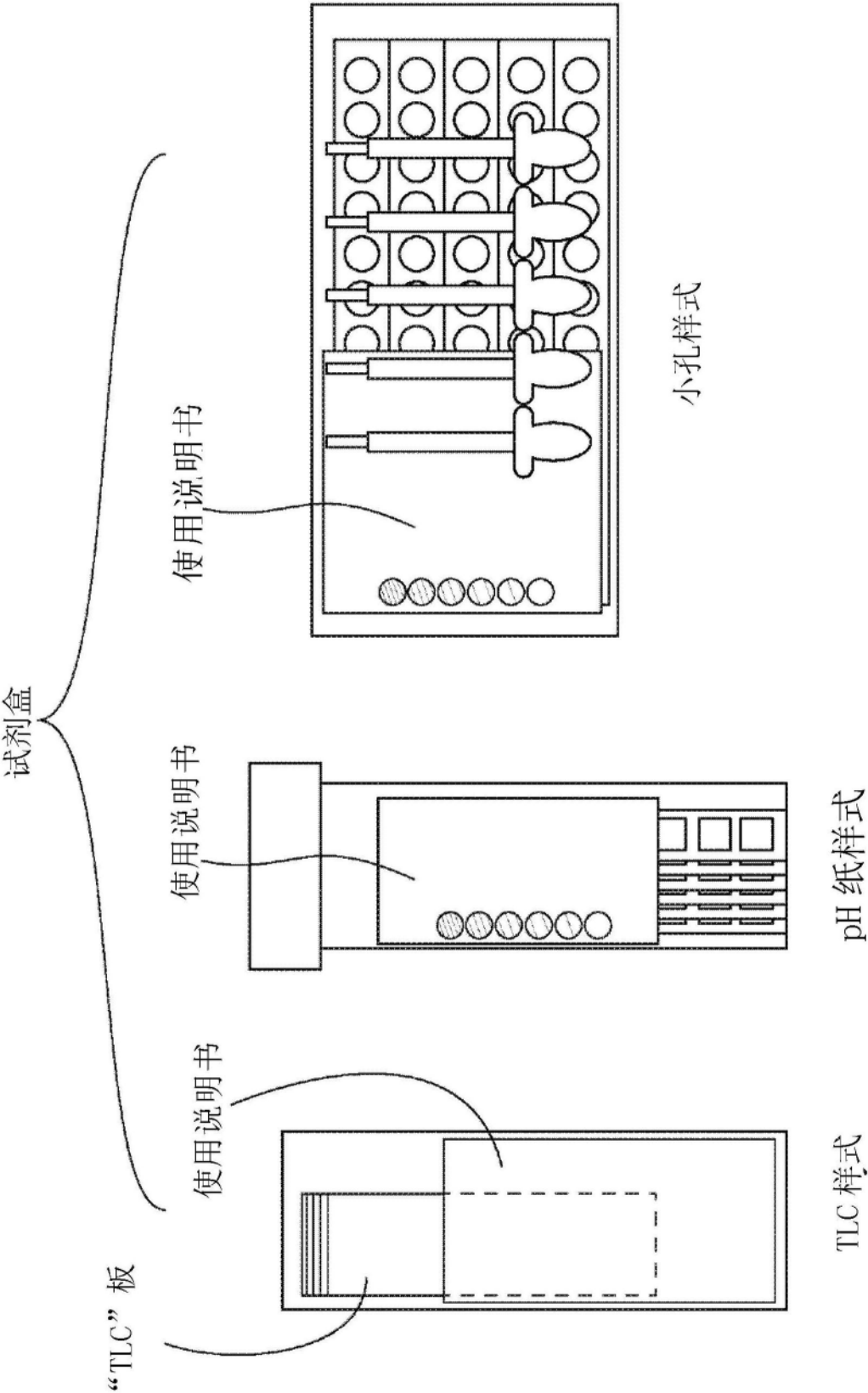


图9